

· 论 著 ·

【编者按】 2009年卫生部发布的《医疗技术临床应用管理办法》指出，干细胞移植技术“涉及重大伦理问题，安全性、有效性尚需经规范的临床试验研究进一步验证”，并将其归为“第三类医疗技术”。目前，干细胞移植技术的有效性及安全性尚未达成共识。黄斯勇等所在课题组采用的人脐带间充质干细胞（hUC-MSCs）符合《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则（试行）》《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》《细胞移植治疗技术规范》（征求意见稿）等相关法律法规要求，并充分获得患者、产妇或其亲属授权，符合伦理学原则及知情同意要求，研究证实，采用酶消化法能有效分离、培养hUC-MSCs，流式细胞术及成骨、成脂诱导分化实验能有效鉴定hUC-MSCs分化能力，且hUC-MSCs治疗难治性免疫性血小板减少症（ITP）的近期疗效较好，不良反应轻微，可能成为难治性ITP的新治疗方法。敬请关注！

人脐带间充质干细胞分离、鉴定方法及其治疗难治性免疫性血小板减少症的有效性及安全性研究

黄斯勇¹，白喜龙¹，伍艳兰²，胡彬¹，王刚锋¹，王颖¹，张蓉¹，罗红香¹，徐静¹，梁英民¹

【摘要】 **目的** 探讨人脐带间充质干细胞（hUC-MSCs）分离、鉴定方法及其治疗难治性免疫性血小板减少症（ITP）的有效性及安全性。**方法** 选取2016年12月—2017年7月西安高新医院收治的难治性ITP患者6例。脐带取自足月剖宫产健康产妇，采用酶消化法分离、培养hUC-MSCs，BD FACSCalibur流式细胞仪检测hUC-MSCs免疫表型，成骨、成脂诱导分化实验评估hUC-MSCs分化能力。6例患者均静脉输注hUC-MSCs（ $1 \times 10^6/\text{kg}$ ），输注后1个月如患者血小板计数 $\leq 50 \times 10^9/\text{L}$ 可重复输注1次。所有患者至少随访3个月，随访截至2017-11-01，观察患者临床疗效、复发情况及治疗期间不良反应发生情况，并采用流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群表达情况。**结果** 采用酶消化法分离、培养hUC-MSCs，可见原代细胞贴壁生长并逐渐融合成片状，形态均一，倒置相差显微镜下观察细胞类似于成纤维细胞，成长梭形流水状贴壁生长，细胞形态良好，并随着细胞传代，细胞形态未发生变化。流式细胞术检测结果显示，hUC-MSCs高表达CD₇₃、CD₉₀、CD₁₀₅，表达量均 $>98.0\%$ ；不表达或低表达CD₃、CD_{11b}、CD₁₉。成骨、成脂诱导分化实验结果显示，hUC-MSCs能向成骨细胞、脂肪细胞分化。输注hUC-MSCs后，6例患者完全反应3例，有效2例，无效1例，总有效率为5/6；随访期间复发1例，再次输注hUC-MSCs后仍有效。hUC-MSCs输注前后患者外周血CD₃⁺CD₄⁺T淋巴细胞比例、CD₃⁺CD₈⁺T淋巴细胞比例及CD₁₉⁺B淋巴细胞比例比较，差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）；hUC-MSCs输注后CD₁₆⁺CD₅₆⁺自然杀伤细胞（NK细胞）比例和CD₄⁺CD₂₅⁺CD₁₂₇⁻辅助性T细胞（Treg细胞）比例均高于hUC-MSCs输注前（ $P < 0.05$ ）。本组患者治疗期间2例出现轻度发热，对症处理后完全缓解；1例患者出现激素依赖，经抗病毒治疗后痊愈。**结论** 采用酶消化法能有效分离、培养hUC-MSCs，流式细胞术及成骨、成脂诱导分化实验能有效鉴定hUC-MSCs分化能力，且hUC-MSCs治疗难治性ITP的近期疗效较好，不良反应轻微，可能成为难治性ITP的新治疗方法。

【关键词】 免疫性血小板减少症；脐带；间充质干细胞；细胞分离；治疗效果

【中图分类号】 R 558.2 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2017.12.005

黄斯勇，白喜龙，伍艳兰，等. 人脐带间充质干细胞分离、鉴定方法及其治疗难治性免疫性血小板减少症的有效性及安全性研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25 (12): 16-22. [www.syxnf.net]

HUANG S Y, BAI X L, WU Y L, et al. Separation and identification methods of human umbilical cord mesenchymal stem cells and its effectiveness and safety in treating refractory immune thrombocytopenia [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2017, 25 (12): 16-22.

Separation and Identification Methods of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Its Effectiveness and

基金项目：国家自然科学基金青年基金项目（81300397）

1. 710075 陕西省西安市，西安高新医院血液科

2. 710038 陕西省西安市，空军军医大学唐都医院疾病预防控制科

通信作者：梁英民，E-mail: liangym@fmmu.edu.cn

Safety in Treating Refractory Immune Thrombocytopenia HUANG Si-yong¹, BAI Xi-long¹, WU Yan-lan², HU Bin¹, WANG gang-feng¹, WANG Ying¹, ZHANG Rong¹, LUO Hong-xiang¹, XU Jing¹, LIANG Ying-min¹

1. Department of Hematology, Xi'an Gaoxin Hospital, Xi'an 710075, China

2. Department of Disease Prevention and Control, Tangdu Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China

Corresponding author: LIANG Ying-min, E-mail: liangym@fmmu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the separation and identification methods of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUC-MSCs) and its effectiveness and safety in treating refractory immune thrombocytopenia (ITP). **Methods** A total of 6 patients with refractory ITP were selected in Xi'an Gaoxin Hospital from December 2016 to July 2017. Umbilical cord was collected from mature healthy parturients underwent caesarean section, enzymatic digestion method was used to separate and culture hUC-MSCs, BD FACSCalibur Flow Cytometer was used to detect the immunophenotyping of hUC-MSCs, and the differentiation ability of hUC-MSCs was evaluated by osteosynthesis and adipogenesis induced differentiation experiment. All of the 6 patients received intravenous infusion of hUC-MSCs ($1 \times 10^6/\text{kg}$), thereinto patient with PLT equal or less than $50 \times 10^9/\text{L}$ 1 month after intravenous infusion of hUC-MSCs received repeat intravenous infusion of hUC-MSCs. All of the 6 patients were followed up for 3 months at least, the expiration date was 2017-11-01; clinical effect, relapse and incidence of adverse reactions during the treatment were observed, and flow cytometry was used to detect the expression of peripheral blood lymphocyte subsets. **Results** Enzymatic digestion results showed primarily cultured cells growth adheres to the wall and schistose conjugation little by little, with homogeneous form; inverted phase contrast microscope showed fibroblast-like cells with long fusiform and flowing water shape growth adheres to the wall, and the cellular morphology was good, meanwhile as the cells propagation, the cellular morphology did not occurred obvious change. Flow cytometry detection results showed that, expressions of CD₇₃, CD₉₀ and CD₁₀₅ were significantly high in hUC-MSCs (all over 98.0%), while expressions of CD₃, CD_{11b} and CD₁₉ were significantly low or negative. Osteosynthesis and adipogenesis induced differentiation experiment showed that, hUC-MSCs can differentiate into osteoblast and adipocyte. After intravenous infusion of hUC-MSCs, 3 cases got complete response, 2 cases were effective, 1 case was invalid, the total effective rate was 5/6; 1 case occurred relapse during the follow-up, but repeat intravenous infusion of hUC-MSCs was still effective. After intravenous infusion of hUC-MSCs, peripheral blood CD₃⁺CD₄⁺ T-lymphocyte ratio, CD₃⁺CD₈⁺ T-lymphocyte ratio or CD₁₉⁺ B-lymphocyte ratio was not statistically significantly different with that before intravenous infusion of hUC-MSCs, respectively ($P > 0.05$), while CD₁₆⁺CD₅₆⁺ natural killer cells ratio and CD₄⁺CD₂₅⁺CD₁₂₇⁻ T helper cells ratio were statistically significantly higher than those before intravenous infusion of hUC-MSCs ($P < 0.05$). During the treatment, 2 cases occurred mild fever and completely relieved after symptomatic treatment; 1 case occurred steroid dependence and cured after anti-virus therapy. **Conclusion** Enzymatic digestion method is effective to separate and culture hUC-MSCs; flow cytometry, osteosynthesis and adipogenesis induced differentiation experiment can effectively identify the differentiation ability of hUC-MSCs; hUC-MSCs has good recent clinical effect in treating refractory ITP with mild adverse reactions, may be a new therapeutic method for refractory ITP.

【Key words】 Immune thrombocytopenia; Umbilical cord; Mesenchymal stem cells; Cell separation; Treatment outcome

人脐带间充质干细胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells, hUC-MSCs) 是从人脐带华通胶中分离出来的一种基质细胞, 在疾病治疗方面具有广阔的应用前景, 已成为国内外研究热点之一。免疫性血小板减少症 (immune thrombocytopenia, ITP) 是一种自身免疫系统疾病, 其主要发病机制是机体对自身抗原的免疫耐受, 导致免疫介导的血小板破坏增多及巨核细胞生成血小板减少, 是临床常见的出血性疾病之一。目前, 临床治疗 ITP 以皮质激素、免疫抑制剂及脾切除为主, 但复发率较高, 且长期使用皮质激素的不良反应较多, 尤其是难治性 ITP, 尚缺乏有效的治疗手段^[1-2]。近年有研究显示, 脐带间充质干细胞 (UC-MSCs) 具

有低免疫原性和免疫调节性, 为 ITP 的治疗提供了新思路^[3]。本研究旨在探讨 hUC-MSCs 分离、鉴定方法及其治疗难治性 ITP 的有效性及安全性, 现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2016 年 12 月—2017 年 7 月西安高新医院收治的难治性 ITP 患者 6 例, 均符合 ITP 诊断标准^[2], 且经糖皮质激素、免疫球蛋白、免疫抑制剂或促血小板生成素等治疗无效、复发, 或不能耐受免疫抑制剂维持治疗。排除标准: (1) 合并严重心、肺、肾等重要脏器疾病者; (2) 合并 3 级及以上心肺功能不全者; (3) 对间充质干细胞或制备试剂过敏者; (4) 合并肿瘤或肿瘤高危风险者。本研究经西安高新医院医学

伦理委员会审核批准,所有患者及其家属自愿参加并在充分了解治疗方案前提下签署知情同意书。

1.2 hUC-MSCs分离、鉴定方法

1.2.1 主要试剂 DMEM/F12 细胞培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS) (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)、胎牛血清 (美国 Gemini 公司)、胰蛋白酶消化液、左旋谷氨酰胺、 β -巯基乙醇 (β -ME)、二甲基亚砜 (DMSO)、青链霉素混合液 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司)、重组人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF)、丁基羟基茴香醚 (BHA)、Forskolin 腺苷酸环化酶激活剂 (美国 Aladdin 公司)、全反式维甲酸 (美国 Sigma 公司)、氯化可的松、胰岛素、氯化钾、氯化钠、HEPES、氯化镁、氯化钙、Glucose、Glycine (北京索莱宝科技有限公司)、表皮细胞生长因子 (EGF)、B-27 添加剂 (美国 Gibco 公司)。

1.2.2 hUC-MSCs组织来源 脐带取自足月剖宫产健康产妇,且产妇乙型肝炎病毒 (HBV) 抗原、抗丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体、抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 抗体、抗梅毒螺旋体抗体、支原体、抗 EB 病毒抗体、抗巨细胞病毒抗体等检测均为阴性。经产妇或其亲属授权同意并签署知情同意书,留取新鲜脐带,并立即放入盛有 DMEM/F12 细胞培养基的容器中密封。在容器外贴上标签,注明产妇姓名、住院号和新生儿出生时间、性别、体质量。

1.2.3 hUC-MSCs分离和培养 由陕西圆梦生命科学研究院干细胞与转化研究中心依据《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则 (试行)》《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》《细胞移植治疗技术规范》(征求意见稿)等相关法律法规要求,参照文献[4],采用酶消化法在无菌条件下于超净台内用含 100 U 青链霉素混合液的 PBS 充分冲洗脐带,尽量清除残留积血。用无菌组织剪将脐带剪成 1~2 mm³ 大小的组织块,随后将组织块悬液转移至 50 ml 离心管中,加入终浓度为 0.1% 的胶原酶 II,37 °C 条件下消化 1 h。将组织块悬液转移至离心管内,室温条件下 2 000 r/min 离心 30 min,弃去上清液,采用 PBS 重悬组织块,加入终浓度为 0.125% 胰蛋白酶消化液,37 °C 条件下消化 30 min,随后加入 10% 胎牛血清,终止消化。消化混合物经 200 目细胞筛过滤,滤去未完全消化组织,将滤液收集至离心管中,室温下 2 000 r/min 离心 20 min,弃去上清液,收集细胞。采用 DMEM/F12 细胞培养基重悬分离细胞,反复吹打混匀,计数细胞。将细胞浓度调整为 10⁶/cm²,接种于 10 cm 培养皿中,置于 37 °C、5% 二氧化碳 (CO₂) 培养箱中培养。培养 72 h 后弃去旧培养基,用无菌 PBS 轻柔、缓慢冲洗细胞生长表面,去除未

贴壁细胞,更换新鲜 DMEM/F12 细胞培养基。之后每 3 d 更换 1 次培养基,倒置相差显微镜下观察各阶段细胞形态变化,并拍照记录。待贴壁细胞生长达 80~90% 融合度时用 0.25% 胰蛋白酶消化液消化传代,获得原代细胞。

1.2.4 hUC-MSCs 免疫表型鉴定 收集第 3 代 hUC-MSCs,采用含 0.1% 胎牛血清的 PBS 洗涤 1 次,室温条件下 1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清。用含 0.1% 胎牛血清的 PBS 重悬细胞,并调整细胞密度为 10⁶/ml,将细胞悬液转移至流式管,每个流式管加入 100 μ l 细胞悬液。分别加入 PE 标记的小鼠抗人单克隆抗体 CD₇₃、CD₉₀、CD₁₀₅ 及 APC 标记的小鼠抗人单克隆抗体 CD₃、CD_{11b}、CD₁₉,同时设抗 PE 小鼠 IgG1 和抗 APC 小鼠 IgG1 为同型对照。加入抗体浓度为 100:5,充分振荡细胞悬液,避光 4 °C 孵育 30 min。经 BD FACSCalibur 流式细胞仪检测,采用 Cellquest Pro 软件分析结果。

1.2.5 成骨诱导分化实验 将生长状态良好的第 3 代 hUC-MSCs 以 5 × 10⁴/孔接种于 6 孔板中,应用 DMEM/F12 细胞培养基培养 12~18 h。待细胞完全贴壁后更换成骨诱导培养基 (DMEM/F12 细胞培养基、10% FBS、100 U 青霉素/链霉素、1 mM 丙酮酸钠、2 mM 左旋谷氨酰胺、1 μ M 地塞米松、10 mM β -磷酸甘油和 50 μ g/ml 抗坏血磷酸盐)。每隔 3 d 更换 1 次培养基,诱导 18 d,对细胞行茜素红染色,显微镜下观察细胞,并拍照记录。以茜素红染色呈红色为阳性。

1.2.6 成脂诱导分化实验 将生长状态良好的第 3 代 hUC-MSCs 以 5 × 10⁴/孔接种于 6 孔板中,应用 DMEM/F12 细胞培养基培养 12~18 h。待细胞完全贴壁后更换成脂诱导培养基 (DMEM/F12 细胞培养基、10% 胎牛血清、100 U 青霉素/链霉素、1 mM 丙酮酸钠、2 mM 左旋谷氨酰胺、1 μ M 地塞米松、0.5 mM IBMX、0.5 mM 消炎痛和 10 μ M 胰岛素)。每 3 d 更换 1 次培养基,诱导 21 d,行油红 O 染色,显微镜下观察细胞,并拍照记录。以油红 O 染色后观察到脂滴为阳性。

1.3 治疗方法 6 例患者均输注 hUC-MSCs (1 × 10⁶/kg),输注后 1 个月如患者血小板计数 (PLT) \leq 50 × 10⁹/L 可重复输注 1 次。输注途径为通过输血器静脉输注,输注前给予异丙嗪、葡萄糖酸钙预防过敏,输液速度约为 60 滴/min,输注 24 h 内严密观察患者生命体征变化。

1.4 观察指标 所有患者至少随访 3 个月,随访截至 2017-11-01,观察临床疗效、复发情况及治疗期间不良反应发生情况。完全反应:治疗后 PLT \geq 100 × 10⁹/L 且无出血;有效:治疗后 PLT \geq 30 × 10⁹/L 且较基础

PLT 增加 ≥ 2 倍, 无出血; 无效: 治疗后 PLT $< 30 \times 10^9/L$ 或较基础 PLT 增加 < 2 倍或有出血; 复发: 治疗有效后, PLT 降至 $30 \times 10^9/L$ 以下或是基础 PLT 的 2 倍以下或出现出血症状^[2]。需要注意的是评价临床疗效时需至少检测 2 次 PLT, 且两次检测时间至少间隔 7 d; 评价病情是否复发时需至少检测 2 次 PLT, 且两次检测时间至少间隔 1 d。总有效率 = (完全反应 + 有效) / 总例数 $\times 100\%$ 。

1.5 流式细胞术检测外周血淋巴细胞亚群表达情况
hUC-MSCs 输注前和输注后第 14 天采用流式细胞仪检测患者外周血淋巴细胞亚群, 具体如下: 取 3 只流式管分别标记为 A、B、C, 分别加入 $20 \mu l$ ($CD_3/CD_8/CD_4$)、($CD_3/CD_{16}^+CD_{56}/CD_{19}$)、($CD_4/CD_{127}/CD_{25}$) 抗体。将患者新鲜外周血充分混匀, 分别取 $50 \mu l$ 外周血加入 A、B、C 流式管中; 避光染色 15 min, 加入溶血素 $450 \mu l$ 。避光 10 min, $1\ 000\ r/min$ 离心 5 min, 弃上清, 加入 0.9% 氯化钠溶液 $500 \mu l$ 重悬细胞。采用 BDFACS Calibur 流式细胞仪上样, Cellquest Pro 软件分析结果。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理, 符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 组内比较采用配对 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

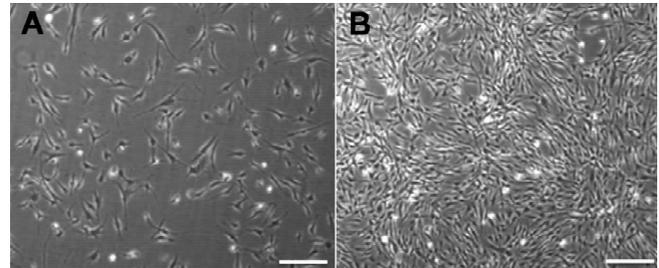
2 结果

2.1 hUC-MSCs 形态学鉴定 采用酶消化法分离、培养 hUC-MSCs, 可见原代细胞贴壁生长并逐渐融合成片状, 形态均一, 倒置相差显微镜下观察细胞类似于成纤维细胞, 成长梭形流水状贴壁生长, 细胞形态良好, 并随着细胞传代, 细胞形态未发生变化 (见图 1)。

2.2 hUC-MSCs 免疫表型 流式细胞术检测结果显示, hUC-MSCs 高表达 CD_{73} 、 CD_{90} 、 CD_{105} , 表达量均 $> 98.0\%$; 不表达或低表达 CD_3 、 CD_{11b} 、 CD_{19} (见图 2)。

2.3 hUC-MSCs 分化能力 正常 hUC-MSCs 呈长椭圆形

(见图 3A); 第 3 代 hUC-MSCs 成骨诱导 18 d, 细胞聚集汇合且呈多层重叠生长, 形成圆形钙化结节沉积, 周围折光性增强, 茜素红染色着色呈红色 (见图 3B); 第 3 代成脂诱导 21 d, 油红 O 染色, 倒置显微镜下观察 hUC-MSCs 形成较大的脂滴 (见图 3C)。



注: A 为放大 40 倍, B 为放大 100 倍

图 1 倒置相差显微镜下 hUC-MSCs 形态学表现

Figure 1 Morphological features of hUC-MSCs under inverted phase contrast microscope

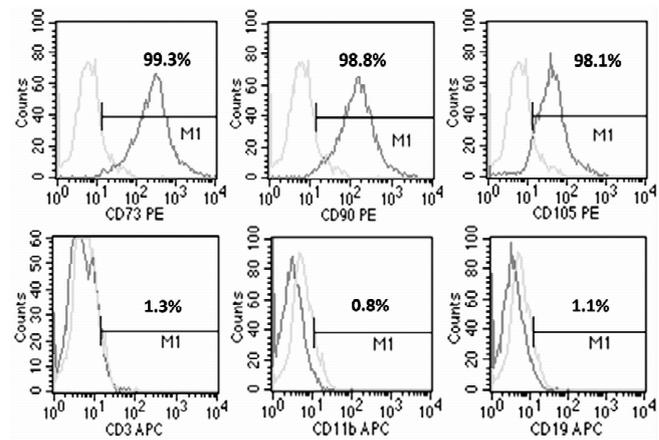
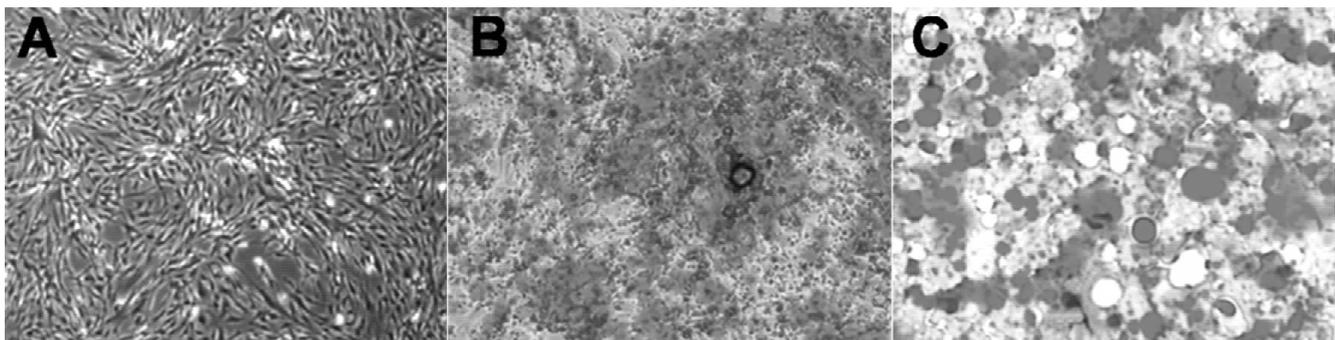


图 2 hUC-MSCs 免疫表型表达情况

Figure 2 Expression of hUC-MSCs immunophenotyping



注: A 为正常人脐带间充质干细胞 (hUC-MSCs) (倒置相差显微镜, $\times 100$); B 为 hUC-MSCs 成骨分化 (茜素红染色, $\times 100$); C 为 hUC-MSCs 成脂分化 (油红 O 染色, $\times 100$)

图 3 hUC-MSCs 分化能力

Figure 3 Differentiation ability of hUC-MSCs

2.4 临床特征及临床疗效 本组患者中男 2 例，女 4 例；年龄 42~73 岁，中位年龄 63 岁；前期治疗包括泼尼松 (Pred)、静脉注射丙种球蛋白 (IVIg)、重组人促血小板生成素 (rhTPO)、环孢素 (CyA)、地塞米松 (Dex)，详见表 1。输注 hUC-MSCs 后，完全反应 3 例，有效 2 例，无效 1 例，总有效率为 5/6；中位随访时间为 5 个月，随访期间复发 1 例，再次输注 hUC-MSCs 后仍有效。

表 1 6 例患者临床特征

Table 1 Clinical features of the 6 patients

序号	年龄 (岁)	性别	病程 (月)	前期治疗	hUC-MSCs 计数 ($\times 10^7$)	PLT ($\times 10^9/L$)		起效时间 (d)
						治疗前	治疗后	
P1	46	女	4	Pred,IVIg,rhTPO	8.4	2	67	16
P2	65	女	7	Pred,IVIg,CyA,rhTPO	6.0	12	146	11
P3	73	女	33	Pred,IVIg,CyA,hUC-MSCs	5.7	23	87	7
P4	63	女	6	Pred,IVIg,CyA,rhTPO	8.3	17	101	10
P5	63	男	10	Pred,Dex,IVIg,CyA,rhTPO	7.1	4	21	16
P6	42	男	12	Pred,Dex,IVIg,CyA,rhTPO	7.3	9	162	22

注：hUC-MSCs = 人脐带间充质干细胞，PLT = 血小板计数，Pred = 泼尼松，IVIg = 静脉注射丙种球蛋白，rhTPO = 重组人促血小板生成素，CyA = 环孢素，Dex = 地塞米松

2.5 淋巴细胞亚群 hUC-MSCs 输注前后患者外周血 $CD_3^+CD_4^+$ T 淋巴细胞比例、 $CD_3^+CD_8^+$ T 淋巴细胞比例及 CD_{19}^+ B 淋巴细胞比例比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)；hUC-MSCs 输注后 $CD_{16}^+CD_{56}^+$ 自然杀伤细胞 (NK 细胞) 比例和 $CD_4^+CD_{25}^+CD_{127}^-$ 辅助性 T 细胞 (Treg 细胞) 比例均高于 hUC-MSCs 输注前，差异有统计学意义 ($P < 0.05$ ，见表 2)。

表 2 难治性 ITP 患者 hUC-MSCs 输注前后外周淋巴细胞亚群比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Table 2 Comparison of peripheral lymphocyte subsets before and after intravenous infusion of hUC-MSCs in refractory ITP patients

组别	例数	$CD_3^+CD_4^+$ T 淋巴细胞比例	$CD_3^+CD_8^+$ T 淋巴细胞比例	CD_{19}^+ B 淋巴细胞比例	$CD_{16}^+CD_{56}^+$ NK 细胞比例	$CD_4^+CD_{25}^+CD_{127}^-$ Treg 细胞比例
输注前	6	44.01 ± 7.25	34.06 ± 8.57	12.06 ± 5.20	6.41 ± 3.06	1.24 ± 0.45
输注后	6	39.92 ± 10.12	31.39 ± 9.74	8.99 ± 6.95	20.47 ± 12.96	5.08 ± 2.68
t 值		0.805	0.504	0.966	2.586	3.461
P 值		0.440	0.625	0.407	0.027	0.006

注：NK 细胞 = 自然杀伤细胞，Treg 细胞 = 辅助性 T 细胞

2.6 不良反应 本组患者治疗期间 2 例出现轻度发热，对症处理后 1~4 h 完全缓解，无其他不适感；1 例患者输注前出现激素依赖，Pred (50 mg/d) 维持治疗过程中出现腹泻、肺部感染，输注后第 10 天原有肺部感染加重伴气喘，后经支气管镜肺泡灌洗和病毒 DNA 定量

检测证实为巨细胞病毒性肺炎，经抗病毒治疗后痊愈，停用激素治疗后 PLT 维持正常至随访结束；其余患者 hUC-MSCs 输注后一般状况良好，生命体征平稳，血生化检查等均未发生明显异常。

3 讨论

1968 年，FRIEDENSTEIN 等^[5]首次报道骨髓标本中小部分贴壁细胞在培养过程中能分化成类似骨、软骨集落，并将之称为骨髓多能间充质干细胞。1997 年，PROCKOP 等^[6]成功分离出骨髓间充质干细胞，并发现其具有多向分化潜能，可分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经样细胞和成肌细胞等。间充质干细胞来源于中胚层，可从脂肪、脐血、羊水、牙体等组织中分离出来。足月产胎儿脐带间充质干细胞含量丰富，羊膜、华通胶、脐血和脐血管内皮下内膜均可分离出间充质干细胞，而脐带华通胶中富含的基质细胞即 hUC-MSCs^[7]。既往研究结果显示，显微镜下 hUC-MSCs 呈成纤维细胞样，细胞质丰富，具有贴壁生长特性，增殖率较高，表面均表达 CD_{44} 、 CD_{73} 、 CD_{90} 和 CD_{105} ，不表达 CD_{34} 和 CD_{45} ^[8]，具有分泌血管内皮生长因子、胰岛素样生长因子 1 和肝细胞生长因子等能力^[9]，在不同诱导条件下可分化为骨、软骨和脂肪细胞，在体外或体内均具有低免疫原性，异体移植后不易引起免疫排斥反应。

近年来，随着对间充质干细胞研究的不断深入及临床治疗需要，国际间充质及组织干细胞委员会对来源间充质干细胞提出最低鉴定标准：(1) 在标准培养条件下，间充质干细胞必须具备对塑料底物的贴附特性；(2) 通过流式细胞术检测间充质干细胞 CD_{105} 、 CD_{73} 、 CD_{90} 阳性表达率 $\geq 95\%$ ，且 CD_{45} 、 CD_{34} 、 CD_{14} 或 CD_{11b} 、 CD_{79a} 或 CD_{19} 、人类白细胞抗原 - DR (HLA-DR) 阴性表达率 $\geq 98\%$ ；(3) 在体外通过标准方法诱导，间充质干细胞必须能分化为成骨细胞、脂肪细胞及软骨细胞^[10]。笔者所在医院经医学伦理委员会审核批准，并经产妇或其亲属授权同意，留取足月剖宫产健康产妇的脐带，依据《干细胞制剂质量控制及临床前研究指导原则 (试行)》《人体细胞治疗研究和制剂质量控制技术指导原则》《细胞移植治疗技术规范》(征求意见稿)等相关法律法规要求，在无菌条件下采用组织块法分离培养，得到类似于成纤维细胞、成长梭形流水状贴壁生长的原代细胞，并随着细胞传代，细胞形态未发生变化。流式细胞术检测结果显示，hUC-MSCs 高表达 CD_{73} 、 CD_{90} 、 CD_{105} ，表达量均 $> 98\%$ ；不表达或低表达 CD_3 、 CD_{11b} 、 CD_{19} ，符合国际间充质及组织干细胞委员会制定的间充质干细胞的鉴定标准。本研究成骨、成脂诱导分化实验结果显示，第 3 代 hUC-MSCs 成骨诱导 18 d，细胞

聚集汇合且呈多层重叠生长,形成圆形钙化结节沉积,周围折光性增强,茜素红染色呈红色,提示hUC-MSCs可向成骨细胞分化;第3代成脂诱导21d,油红O染色,倒置显微镜下观察hUC-MSCs形成较大脂滴,提示hUC-MSCs可向脂肪细胞分化。本研究结果提示,陕西圆梦生命科学研究院干细胞与转化研究中心分离的细胞是hUC-MSCs,为下一步临床试验奠定了坚实基础。

大量临床研究和动物实验证实, hUC-MSCs在神经系统疾病、心血管系统疾病、血液系统疾病、免疫系统疾病、糖尿病、肌肉变性疾病、肝脏疾病及慢性疼痛等的治疗中具有广阔的应用前景^[11]。hUC-MSCs具有独特的免疫调节能力、较强的免疫抑制性及低免疫原性,对适应性免疫的抑制作用主要表现为对T淋巴细胞和B淋巴细胞的免疫抑制,对固有免疫的抑制作用主要表现为对单核细胞/巨噬细胞、树突状细胞、NK细胞的免疫抑制^[12]。

ITP的免疫学发病机制与体液免疫异常和细胞免疫异常均密切相关。既往研究结果显示,50%~70%的ITP患者可检测到血小板自身抗体,大多数ITP患者的血小板相关抗体IgG(PAIGG)水平升高,且其水平与血小板寿命呈负相关。CHANG等^[13]研究表明,ITP患者血小板自身抗体产生受T淋巴细胞及其分泌的细胞因子调控。SEMPLE等^[14]研究发现,Th1辅助细胞可增强抗血小板自身免疫反应,而ITP患者Th1/Th2细胞明显升高,下调Th1/Th2细胞可预防ITP的发生,并有助于控制ITP病情。另有研究发现,ITP患者T淋巴细胞凋亡受限,可减少自身反应性T淋巴细胞清除率,从而产生持续的免疫效应,且T细胞可抑制巨核细胞凋亡,减少血小板释放^[15-16]。目前,NK细胞对ITP发生、发展的影响尚未明确,可能既有保护作用,也有破坏作用。MA等^[17]通过hUC-MSCs与ITP患者外周血单个核细胞(PBMC)和骨髓单个核细胞(BM-MNC)共培养实验发现,hUC-MSCs可抑制ITP患者T淋巴细胞和B淋巴细胞增殖,减少自体血小板破坏,促进血小板生成,并逆转巨核细胞功能障碍。徐淑芬等^[18]对12例难治性ITP患者输注hUC-MSCs,每次输注 $(3\sim 5)\times 10^7$ 个细胞,1次/周,共治疗2~3个疗程,4例患者完全反应,4例患者有效,总有效率为8/12。FANG等^[19]应用脂肪来源间充质干细胞(adipose tissue-derived mesenchymal stem cell,AMSC)治疗7例成年ITP患者,移植细胞 $2.0\times 10^6/\text{kg}$,未见明显不良反应,治疗后所有患者PLT有所升高,4例完全反应,且移植后Th1/Th2细胞趋向平衡。

本研究结果显示,6例患者中3例完全反应,2例有效,1例无效,总有效率为5/6;平均随访5个月,1

例患者复发,再次输注hUC-MSCs后仍有效,提示hUC-MSCs治疗难治性ITP效果较好,但仍有复发。本研究结果还显示,hUC-MSCs输注前后外周血 $\text{CD}_3^+\text{CD}_4^+$ T淋巴细胞比例、 $\text{CD}_3^+\text{CD}_8^+$ T淋巴细胞比例及 CD_{19}^+ B淋巴细胞比例间无差异;hUC-MSCs输注后 $\text{CD}_{16}^+\text{CD}_{56}^+$ NK细胞比例和 $\text{CD}_4^+\text{CD}_{25}^+\text{CD}_{127}^-$ Treg细胞比例均高于hUC-MSCs输注前,提示NK细胞和Treg细胞可能在ITP治疗中发挥着重要作用。

综上所述,采用酶消化法能有效分离、培养hUC-MSCs,流式细胞术及成骨、成脂诱导分化实验能有效鉴定hUC-MSCs分化能力,且hUC-MSCs治疗难治性ITP近期疗效较好,不良反应轻微;但本研究样本量较小且未进行随机对照试验,因此hUC-MSCs最佳输注途径、用量、疗程等问题还需进一步深入探讨。

作者贡献:梁英民进行文章的构思与设计,对文章整体负责,监督管理;黄斯勇、白喜龙进行研究的实施与可行性分析;伍艳兰、胡彬、王颖、徐静进行数据收集、整理、分析;黄斯勇、王刚锋进行结果分析与解释;黄斯勇、伍艳兰负责撰写论文;王颖进行论文的修订;张蓉、罗红香负责文章的质量控制及审核。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] PROVAN D, STASI R, NEWLAND A C, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia [J]. *Blood*, 2010, 115 (2): 168-186. DOI: 10.1182/blood-2009-06-225565.
- [2] 中华医学会血液学分会止血与血栓学组. 成人原发性免疫性血小板减少症诊断与治疗中国专家共识(2016年版)[J]. *中华血液学杂志*, 2016, 37 (2): 89-93. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2016.02.001.
- [3] 朱付云, 吴迪炯, 孙洁, 等. 间充质干细胞治疗免疫性血小板减少性紫癜的机制及其研究进展[J]. *国际输血及血液学杂志*, 2012, 35 (2): 173-175. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-419X.2012.02.020.
- [4] KOÇ O N, GERSON S L, COOPER B W, et al. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2000, 18 (2): 307-316.
- [5] FRIEDENSTEIN A J, PETRAKOVA K V, KUROLESOVA A I, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues [J]. *Transplantation*, 1968, 6 (2): 230-247.
- [6] PROCKOP D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues [J]. *Science*, 1997, 276 (5309): 71-74.
- [7] BATSALI A K, KASTRINAKI M C, PAPADAKI H A, et al. Mesenchymal stem cells derived from Wharton's Jelly of the umbilical cord: biological properties and emerging clinical applications [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2013, 8 (2): 144-155.

抗氧化型低密度脂蛋白抗体和血小板参数与高血压肾病的相关性研究

张志涛¹, 张新国², 张红艳², 尤校雷¹

【摘要】 目的 探讨抗氧化型低密度脂蛋白抗体 (ox-LDL-Ab) 和血小板参数与高血压肾病的相关性。方法 选取 2009 年 3 月—2016 年 3 月邯郸市中心医院收治的原发性高血压患者 120 例, 根据高血压肾病发生情况分为 A 组 (未发生高血压肾病, $n=60$) 与 B 组 (发生高血压肾病, $n=60$)。比较两组患者 ox-LDL-Ab、血小板参数 [血小板计数 (PLT)、平均血小板体积 (MPV)、血小板分布宽度 (PDW)], ox-LDL-Ab、血小板参数与高血压肾病的相关性分析采用 Spearman 秩相关分析。结果 B 组患者 ox-LDL-Ab 高于 A 组 ($P<0.05$)。B 组患者 PLT 低于 A 组, MPV、PDW 高于 A 组 ($P<0.05$)。Spearman 秩相关分析结果显示, ox-LDL-Ab、MPV、PDW 与高血压肾病呈正相关 ($r_s=0.867、0.746、0.798, P<0.05$); PLT 与高血压肾病呈负相关 ($r_s=-0.815, P<0.05$)。结论 ox-LDL-Ab 和血小板参数与高血压肾病有关, 临床可通过检查上述指标以早期发现高血压肾病。

【关键词】 高血压, 肾性; 抗氧化型低密度脂蛋白抗体; 血小板参数

【中图分类号】 R 544.14 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2017.12.006

张志涛, 张新国, 张红艳, 等. 抗氧化型低密度脂蛋白抗体和血小板参数与高血压肾病的相关性研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25 (12): 22-25. [www.syxnf.net]

ZHANG Z T, ZHANG X G, ZHANG H Y, et al. Correlations of anti ox-LDL antibody and blood platelet parameters with hypertensive nephropathy [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2017, 25 (12): 22-25.

基金项目: 河北省科技厅项目 (2011055349): 邯郸地区汉族人群高血压相关基因多态性与原发性高血压靶器官损伤的关系研究

1. 056001 河北省邯郸市中心医院泌尿外二科

2. 056001 河北省邯郸市, 河北工程大学医学院

通信作者: 张红艳, E-mail: 13832043890@163.com

[8] FONG C Y, CHAK L L, BISWAS A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(1): 1-16. DOI: 10.1007/s12015-010-9166-x.

[9] ZHU S F, ZHONG Z N, FU X F, et al. Comparison of cell proliferation, apoptosis, cellular morphology and ultrastructure between human umbilical cord and placenta-derived mesenchymal stem cells [J]. Neurosci Lett, 2013, 29, 541: 77-82. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.03.018.

[10] DOMINICI M, LE BLANC K, MUELLER I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8 (4): 315-317.

[11] 李嘉, 尹春艳. 人脐带间充质干细胞在临床治疗中的研究进展 [J]. 医学综述, 2016, 22 (10): 1931-1934.

[12] 易桥, 卢燕勤, 黄宏宇, 等. 间充质干细胞在免疫调节过程中的作用与应用进展 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20 (41): 6216-6224.

[13] CHANG M, NAKAGAWA P A, WILLIAMS S A, et al. Immune thrombocytopenic purpura (ITP) plasma and purified ITP monoclonal autoantibodies inhibit megakaryocytopoiesis in vitro [J]. Blood, 2003, 102 (3): 887-895.

[14] SEMPLE J W, FREEDMAN J. Increased antiplatelet T helper lymphocyte reactivity in patients with autoimmune thrombocytopenia [J]. Blood, 1991, 78 (10): 2619-2625.

[15] ZHANG F, CHU X, WANG L, et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Eur J Haematol, 2006, 76 (5): 427-431.

[16] LI S, WANG L, ZHAO C, et al. CD8⁺ T cells suppress autologous megakaryocyte apoptosis in idiopathic thrombocytopenic purpura [J]. Br J Haematol, 2007, 139 (4): 605-611.

[17] MA L, ZHOU Z, ZHANG D, et al. Immunosuppressive function of mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix in immune thrombocytopenia patients [J]. Thromb Haemost, 2012, 107 (5): 937-950. DOI: 10.1160/TH11-08-0596.

[18] 徐淑芬, 白海, 王存邦, 等. 脐带间充质干细胞治疗难治性原发性血小板减少性紫癜近期疗效 [J]. 中国现代医学杂志, 2014, 24 (33): 35-38.

[19] FANG B, MAI L, LI N, et al. Favorable response of chronic refractory immune thrombocytopenic purpura to mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21 (3): 497-502. DOI: 10.1089/scd.2011.0231.

(收稿日期: 2017-10-16; 修回日期: 2017-12-20)

(本文编辑: 谢武英)